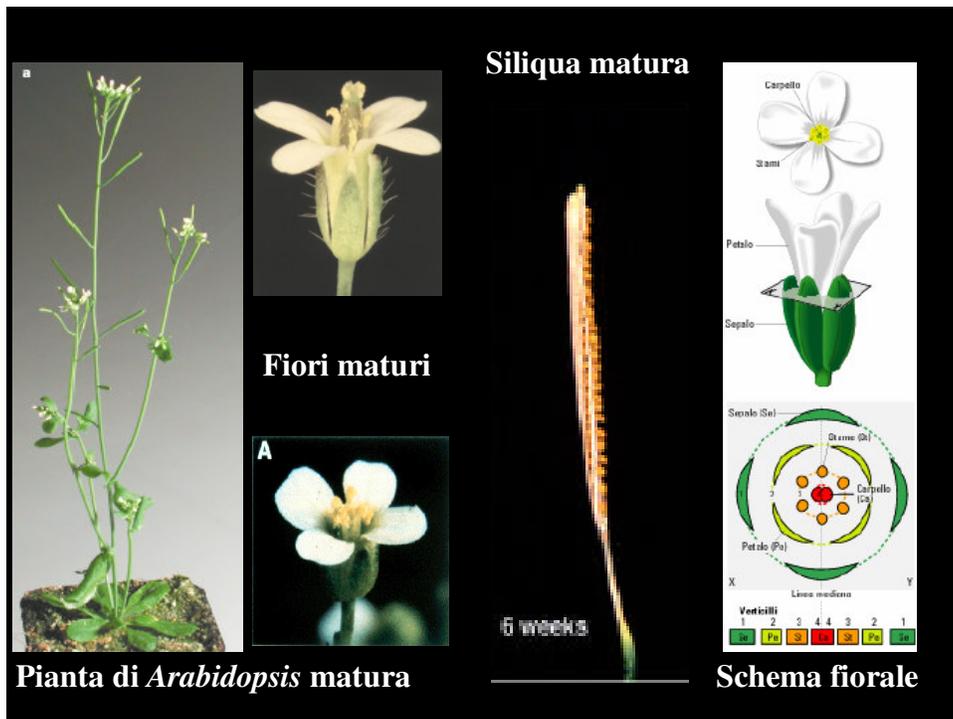


Arabidopsis thaliana

**IL SISTEMA MODELLO DEL
MONDO VEGETALE**

Arabidopsis appartiene alla
famiglia delle Brassicaceae



I vantaggi di *Arabidopsis thaliana*

- Piccola taglia
- Breve ciclo vitale
- Elevata produzione di semi di piccole dimensioni
- Facilmente mutagenizzabile
- Genoma aploide relativamente piccolo
- Facile da trasformare

Piccola taglia



Coltivata su terriccio in camera termostata

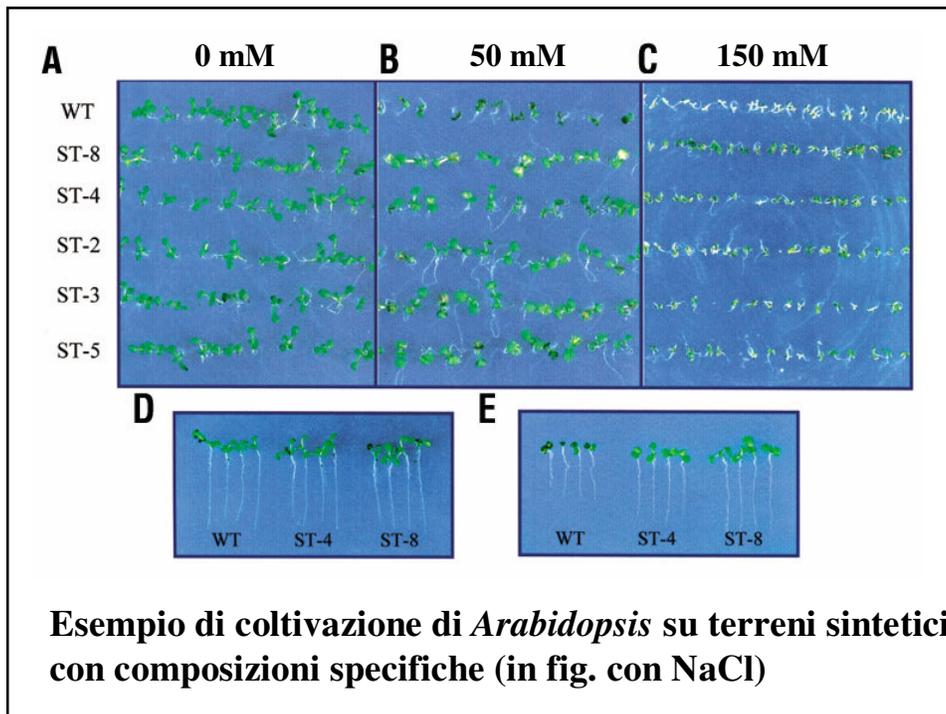
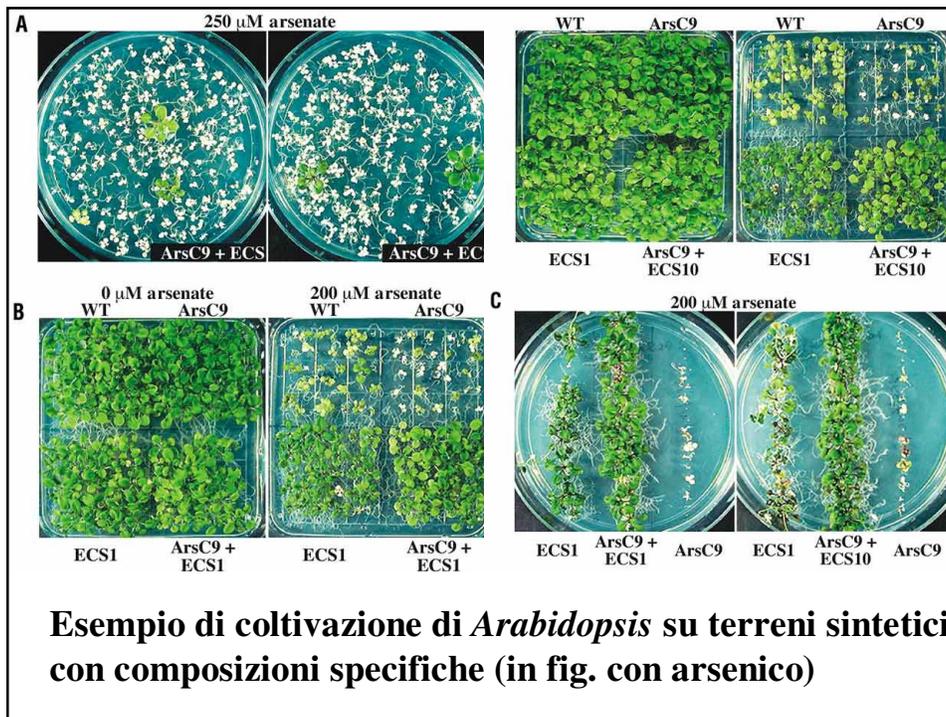
**Le piccole dimensioni permettono di confrontare facilmente
differenti genotipi**



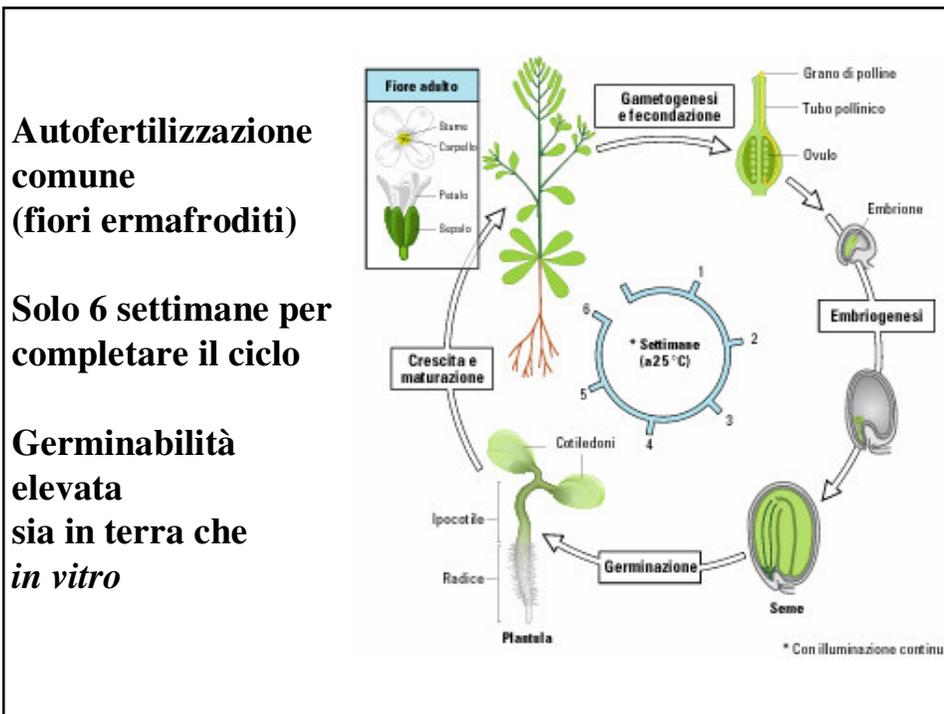
	Control	25 mM	50 mM	100 mM	NaCl
Day 0					WT <i>soot-1</i>
Day 7					WT <i>soot-1</i>
Day 14					WT <i>soot-1</i>

**Coltivata su terreni
sintetici agarizzati**





Breve ciclo vitale



Elevato numero di semi

Una sola pianta di *Arabidopsis* può produrre fino a 10,000 semi, il che permette di allestire con relativa facilità esperimenti di mutagenesi

La piccola dimensione dei semi (0,5 mm) permette di fare screening di centinaia di semi in piastre Petri senza occupare molto spazio permettendo così di identificare mutanti



Facilmente mutagenizzabile

Protocollo di mutagenesi EMS

Weight 0.2 gram seeds (10,000 seeds total) (20 microgram/seed).

Wash in 0.1% Tween 15'

Put into 15 ml ddH₂O

Add 15-45 microliter (0.1% to 0.3%) EMS

Mix and incubate for 8-12 hrs (Rotating) in hood.

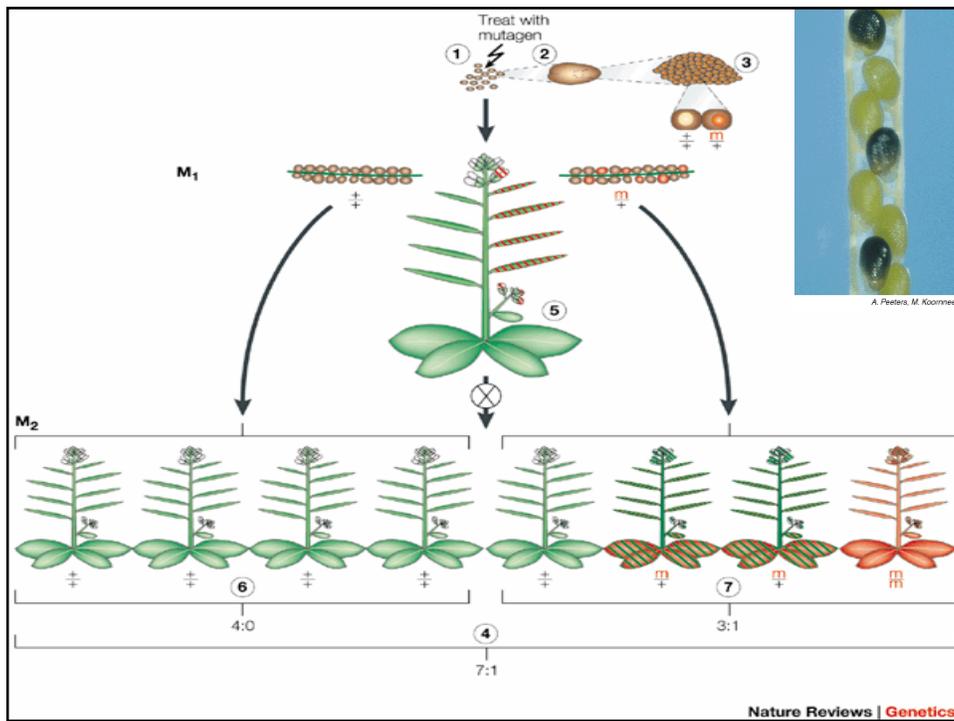
Remove the EMS (put EMS sol'n into 0.5M NaOH O/N, then dispose as regular waste)

Rinse the seeds once and then rinse them in 10 ml ddH₂O 2-4 hrs.

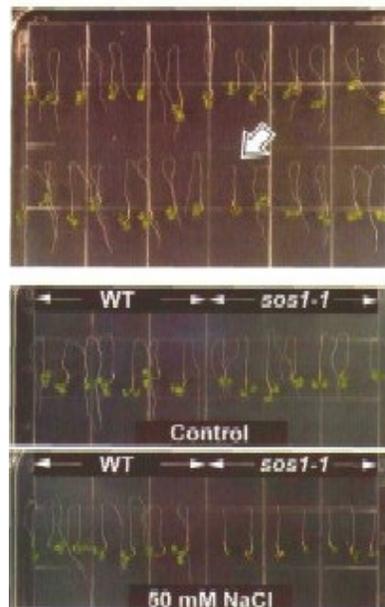
Put all seeds into 100 ml 0.1% Agar (Autoclave agar, cool on ice, and let solidify for several hours first)

Sow the seeds using a P1000 pipette (1 ml per pot).

Vengono introdotte mutazioni puntiformi con transizioni
GC-AT e AT-GC



Le piccole dimensioni delle plantule facilitano lo screening dei mutanti



**Numerosi mutanti sono
disponibili**

**Piante di *Arabidopsis* con fenotipi fiorali mutanti hanno
permesso di scoprire la presenza dei geni omeotici nelle
piante**



Fiore wt



agamous



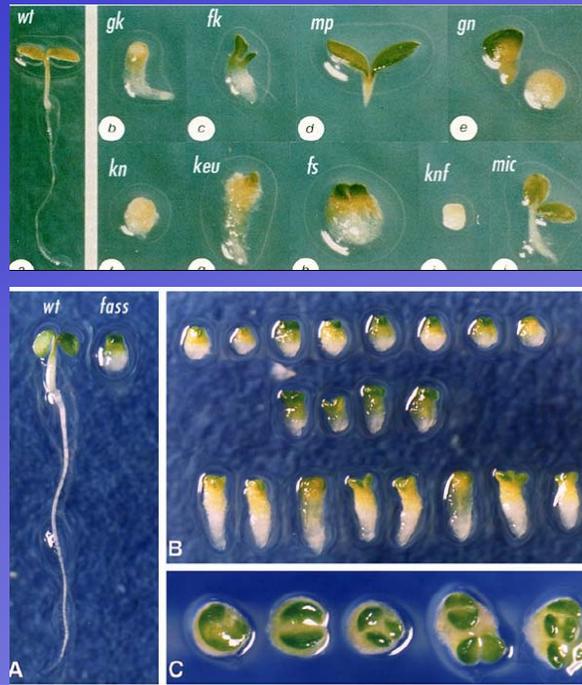
apetala3



apetala2

**Più di 2000 sono i loci mutati
L'autofertilizzazione permette di mantenere facilmente le linee mutate**

Altri mutanti permettono di studiare il pattern di sviluppo dell'embrione e quindi capire i meccanismi di commitment cellulare



Genoma aploide relativamente piccolo

Model genome

The *Arabidopsis* genome was sequenced ahead of schedule and within budget, a model for multinational cooperation. The level of sequence completion without gaps, including repetitive regions of the genome, is unparalleled among multicellular organisms. Importantly, *Arabidopsis* also provides the first sequence of a genome containing methylated DNA. There are about 26,000 nuclear, 80 chloroplast and 60 mitochondrial genes encoding proteins in *Arabidopsis*. The nuclear genome contains around 120 Mb of DNA, excluding telomeric, nucleolar and centromeric tandem repeats. The genomes of crop plants are much larger: rice has about 3 times, tomato 7 times, maize 20 times and wheat 120 times more DNA per cell. *Arabidopsis* is therefore an efficient model for identifying important plant genes and provides a molecular foundation for studying plant diversity.

Il genoma di *Arabidopsis* è il più piccolo tra quello delle piante conosciute

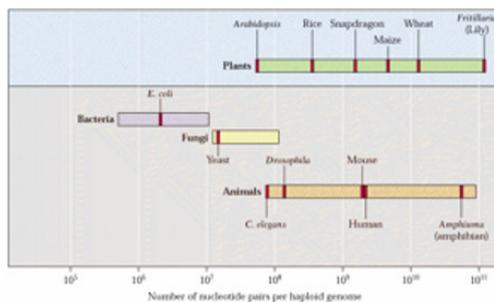
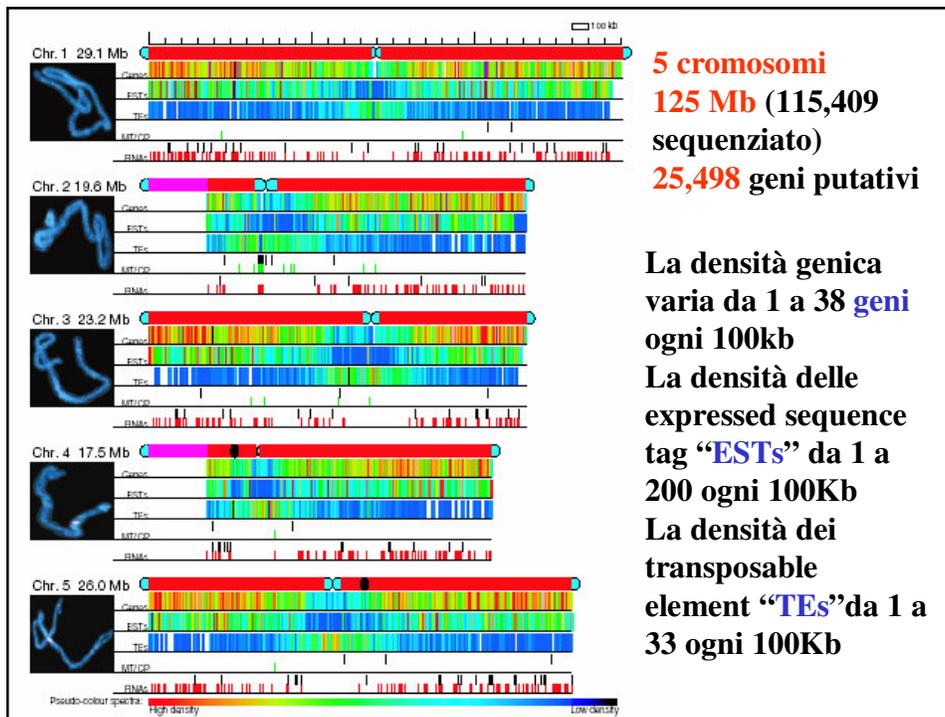


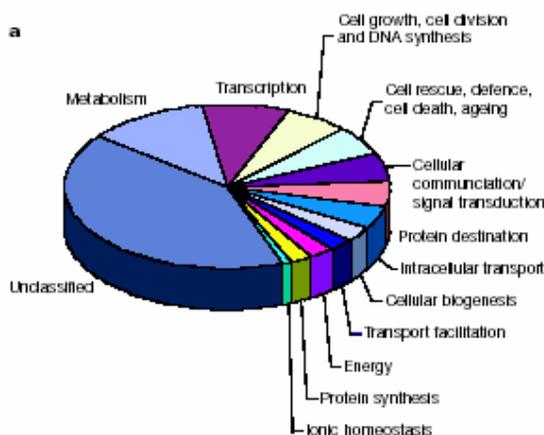
Table 1 - Haploid genome sizes of selected organisms

Organism	haploid genome (kbp)
<i>H. influenzae</i>	1.8×10^3
<i>E. coli</i>	3.5×10^3
yeast	1.4×10^4
<i>Arabidopsis</i>	1.2×10^5
tobacco	1.6×10^6
wheat	5.9×10^6
pea	4.5×10^6



Molti geni sono stati classificati in categorie funzionali grazie allo studio comparato con gli altri organismi modello e geni la cui funzione è conosciuta

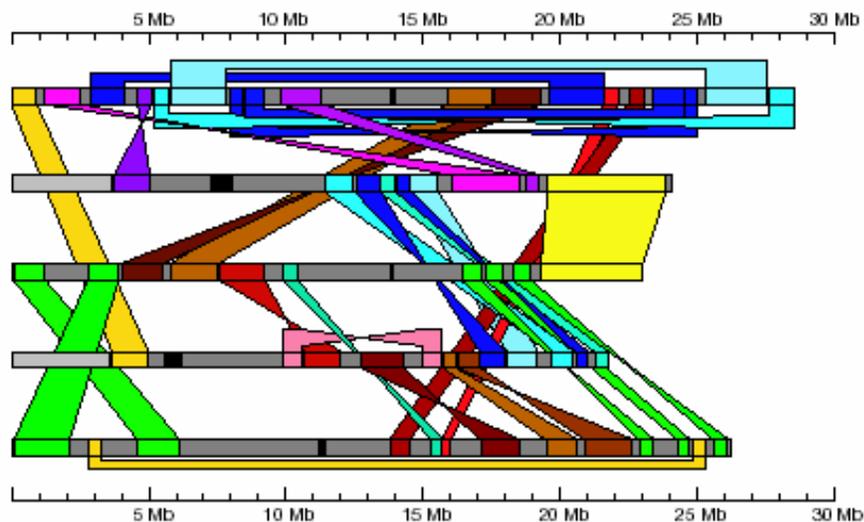
- Il 69% dei geni ha una funzione putativa**
- Il 9% dei geni caratterizzato sperimentalmente**
- Il 30% dei geni codifica per proteine sconosciute**



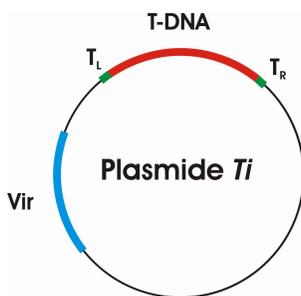
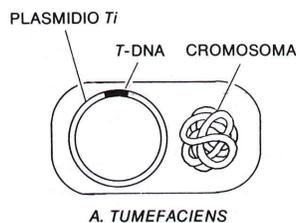
**Il genoma di *Arabidopsis* ha un alto contenuto di DNA non ripetitivo
Solo il 10-15% è altamente ripetuto**

	<i>Arabidopsis</i>	Altre piante	<i>E. coli</i>
DNA unico			
basso n° di copie	50-55%	<10%	>95%
DNA mediamente ripetuto			
ripetuto	23-27%	-20%	NA
DNA altamente ripetuto			
ripetuto	10-15%	-70%	<5%

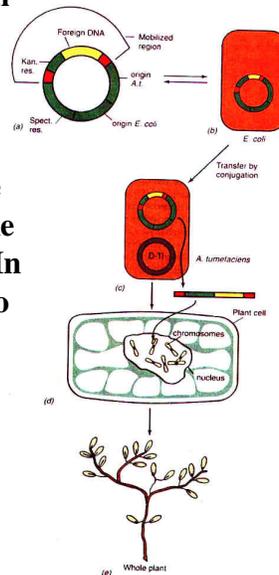
Anche in *Arabidopsis* si sono avute duplicazioni cromosomiche



Trasformazione mediante *Agrobacterium tumefaciens*



Per ottenere piante di *Arabidopsis* transgeniche ci si avvale della collaborazione di un batterio capace di trasferire materiale genetico alle piante. In particolare è in grado di trasferire un frammento specifico chiamato T-DNA.



Esempio di vettore binario

Un vettore binario deve possedere delle precise caratteristiche per poter essere impiegato nella trasformazione vegetale:

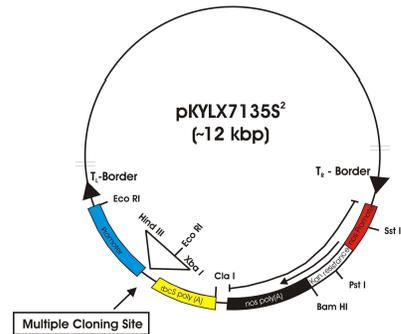
Possedere i border tipici del T-DNA (deve poter lavorare in-trans con il plasmide Ti)

Possedere un marcatore selettivo (per un antibiotico o un erbicida) per la selezione delle piante trasformate

Un'origine di replicazione per *E. coli* e *A. tumefaciens*

Un promotore funzionale in pianta e un marcatore per la selezione dei trasformati

Un sito di policlonaggio



Trasformazione del tabacco



Preparazione degli espianti, formazione della ferita



Co-coltivazione con *A. tumefaciens*



Trasferimento su terreno



Rigenerazione e selezione (mezzo selettivo)

Trasformazione *in planta* di *Arabidopsis*

Il punto cruciale del protocollo è lo stato di salute delle piante e il giusto stadio di crescita.

La tecnica del “floral dip” permette di ottenere piante di *Arabidopsis* transgeniche senza dover passare attraverso stadi di coltura cellulare.

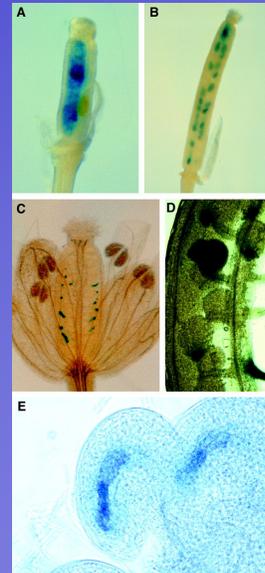


Per la trasformazione le infiorescenze di *Arabidopsis* vengono immerse in un mezzo d'inoculo batterico in presenza di un detergente che svolge un ruolo fondamentale in tale processo

Trasformazione *in planta* di *Arabidopsis*

Gli ovuli sono il bersaglio dell'agrobatterio. La generazione T_0 è quella infiltrata e i semi della T_1 saranno in emizigosi per il transgene. L'autofertilizzazione delle piante T_1 permetterà poi di ottenere semi della generazione T_2 eterozigoti e/o omozigoti per il transgene.

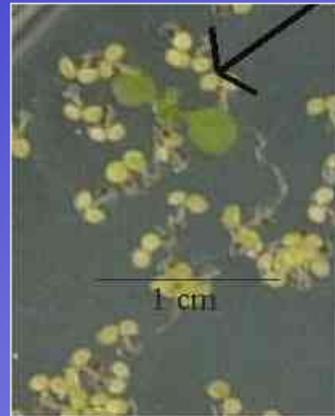
Le regioni blu dell'immagine identificano la presenza del transgene. In molti esperimenti di trasformazione si utilizzano geni reporter. In questo caso il blu è dato dall'attività del gene per la β -glucuronidasi.



L'efficienza di questo sistema di trasformazione è dell'ordine dell'1%. Ogni 100 semi 1 è transgenico.

Per avere semi transgenici è necessario aspettare il tempo di un ciclo vitale completo.

Il grande vantaggio del "floral dip" consiste nella possibilità di ottenere piante transgeniche senza disporre di strutture particolari.



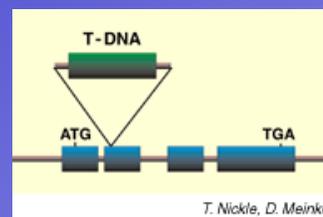
Per la selezione dei trasformati i semi delle piante inoculate con l'*Agrobacterium* vengono fatti germinare in presenza di un agente selettivo.

L'integrazione del T-DNA nei cromosomi avviene in maniera casuale e non-omologa e si possono inserire diverse copie del T-DNA nel genoma vegetale.

Una tale proprietà può essere sfruttata per ottenere mutanti. Infatti l'inserzione casuale del T-DNA può interrompere un gene e quindi rendere il prodotto genico non funzionante.

La costruzione di librerie da piante transgeniche (mutanti inserzionali), o analisi di PCR (TAIL-PCR), permettono l'identificazione del gene mutato in cui il T-DNA si è inserito.

Rispetto al sistema della mutagenesi chimica questo metodo è più potente perché i trasformati, e quindi i possibili mutanti, saranno resistenti all'agente selettivo facilitando lo screening della progenie.



T. Nickle, D. Meinke

Collezione SALK (*Arabidopsis* T-DNA lines)

150,000 piante trasformate con T-DNA contenente il gene *NPTII*

Mediamente 1,5 inserzioni per pianta

225,000 inserzioni indipendenti

88,122 piante per le quali si conosce esattamente il sito di inserzione del T-DNA

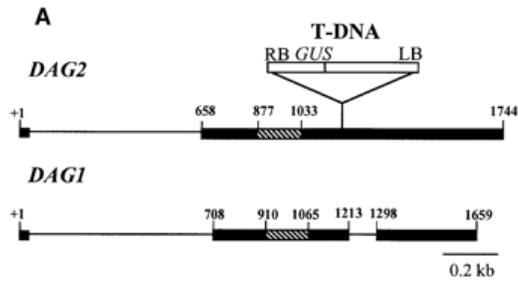
21,799 dei 29,454 geni predetti è mutato (74% del genoma)

Collezione SALK (*Arabidopsis* T-DNA lines)

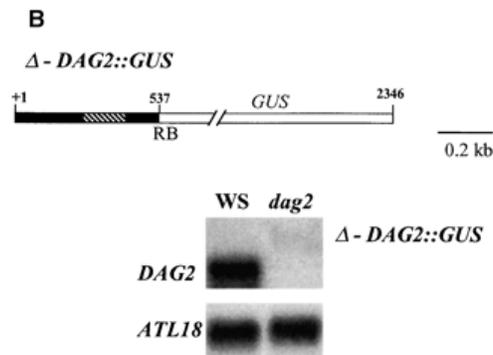
Distribuzione delle inserzioni T-DNA nei geni e nelle regioni intergeniche

	Chr. 1	Chr. 2	Chr. 3	Chr. 4	Chr. 5	Total
Promoter	5,488	3,376	4,452	3,076	4,900	21,292
5'UTR	1,243	737	951	680	1,099	4,710
Coding exon	5,089	2,960	3,988	2,871	4,440	19,348
Intron	2,663	1,507	1,840	1,681	2,284	9,975
3'UTR	1,621	914	1,263	966	1,535	6,299
Intergenic	6,861	4,323	5,180	3,813	6,321	26,498
Total	22,965	13,817	17,674	13,087	20,579	88,122

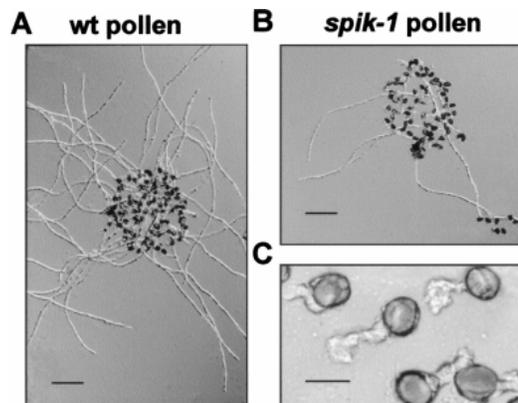
Schematicamente i mutanti inserzionali possono essere rappresentati come nei disegni a fianco



Se il gene è distrutto non si dovrebbe avere la presenza del trascritto



The *spik-1* mutant was obtained by PCR screening of a collection of \square 40,000 *Arabidopsis* T-DNA insertion mutants (Wassilevskija ecotype; library constructed by the Laboratoire de Génétique et Amélioration des Plantes, INRA Versailles, France) with primers corresponding to the *SPIK* gene and to the T-DNA left and right borders. The exact position of the T-DNA insertion was determined by sequencing the T-DNA flanking sequences. Plants homozygous for the disruption and hemizygous plants were selected (by PCR) in the progeny of the positive line.



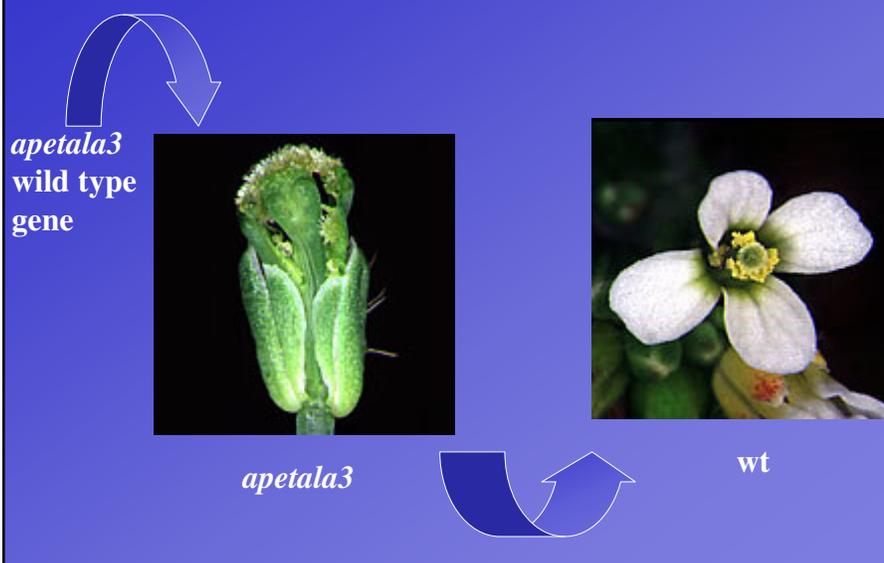
Complementazione di mutanti

La disponibilità di linee mutanti inserzionali di *Arabidopsis* per le quali si conosce il gene “distrutto” permette di semplificare gli esperimenti di complementazione.

Le tecniche di clonaggio e di trasformazione permettono di inserire con relativa facilità nella pianta mutata una copia del gene wild type e di poter così studiare il fenotipo della pianta complementata.

La complementazione di mutante è uno strumento di analisi molto importante perché rappresenta la prova definitiva che un determinato fenotipo alterato è dovuto alla mutazione in un determinato locus genico.

Complementazione di mutanti



Stocks di semi di *Arabidopsis* mutanti inserzionali T-DNA



Identificazione di una pianta mutata
per un gene d'interesse



Analisi fenotipica della pianta mutata



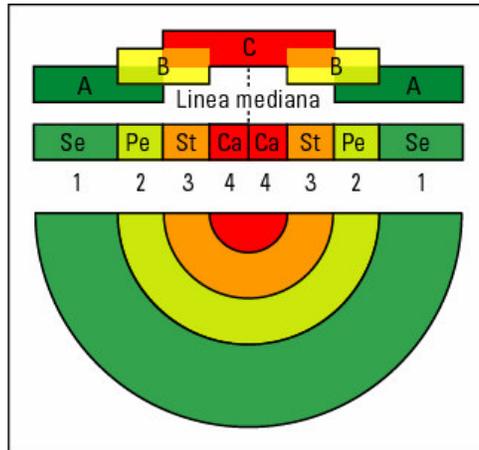
Complementazione pianta mutante con il gene wild type

Arabidopsis è stata fondamentale
nella comprensione di molti
“meccanismi” biologici

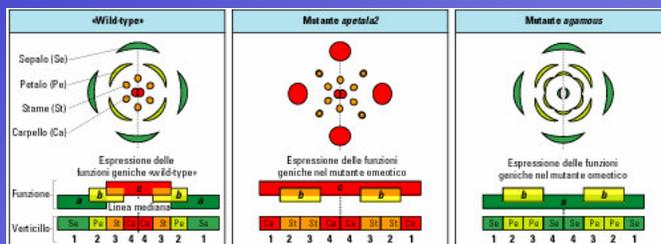
Modello ABC

Lo studio sui mutanti
fiorali ha permesso di
sviluppare il modello per
la determinazione
dell'identità degli organi
fiorali.

Ogni classe di geni
omeotici agisce in due
verticilli adiacenti in
modo che la loro
combinazione specifici
l'identità degli organi.



Modello ABC



Triplo mutante

Green revolution



Regulatory genes first characterized in *Arabidopsis* are often used to recover related genes of agricultural significance from crop plants. A gibberellin response (dwarf) gene in wheat that contributed to improved grain yields during the 'green revolution' was recently isolated in this way.

Hormone biosynthesis



Brassinosteroid plant hormones are synthesized through a complex pathway (background) that has provided valuable insights into growth regulation in plants and steroid biosynthesis in mammals. Normal plant growth (centre) can be disrupted by brassinosteroid insensitivity (left) and overproduction (right).



Signalling

Ethylene is a unique signal molecule that controls many aspects of plant development. Ethylene response mutants of *Arabidopsis* have allowed the identification of receptors and transduction pathways that regulate a variety of fundamental processes, from seedling development in *Arabidopsis* (foreground) to fruit ripening in tomato (background).

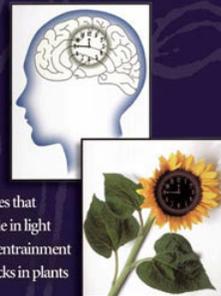
Seed dispersal

Several genes are known to control seed dispersal in *Arabidopsis*. Disruption of these genes prevents normal seed pod opening. Manipulation of related genes in oilseed crops such as canola may in the future reduce seed loss caused by pod shatter.



Biological clocks

Arabidopsis mutants have aided the discovery of photoreceptor proteins known as cryptochromes that play a central role in light perception and entrainment of biological clocks in plants and animals. Plants have evolved complex systems designed to capture light and use environmental signals to regulate flowering and important physiological processes.





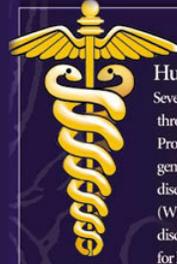
Temperature response

The molecular basis of vernalization, the stimulation of flowering after cold treatment in some plants, has been elucidated through extensive genetic analysis of flowering in *Arabidopsis*. Improved resistance of crop plants to cold temperatures has also been achieved with genes first identified in *Arabidopsis*.



Patterning

Floral organ identity in *Arabidopsis* is controlled by a small number of genes that are found throughout the angiosperms. Genetic analysis of floral architecture in *Arabidopsis* has resulted in the production of mutant flowers with striking aberrations that illuminate floral diversity in nature.



Human disease

Several dozen genes uncovered through the *Arabidopsis* Genome Project are related in sequence to genes associated with human diseases. One example is Menkes (Wilson's) disease. The recent discovery that this gene is required for hormone receptor assembly in

Arabidopsis may provide valuable insights into the complex disease phenotype in humans.

Enhancer trap in *Arabidopsis*

Enhancer trap in *Arabidopsis*

La tecnica dell'enhancer trap consiste nel trasformare le piante con geni reporter (GUS o GFP) regolati da promotori minimali. In base alla regione del genoma in cui si inserisce, il gene reporter verrà espresso solo se sarà inserito in prossimità di un "enhancer" che determinerà così il suo pattern d'espressione.

Basandosi sul concetto che cellule appartenenti allo stesso tessuto od organo presentano un'espressione genica simile, si può pensare di utilizzare piante enhancer trap per seguire lo sviluppo di un organo o un tessuto.

L'espressione differenziale dei geni è spesso il primo segno che cellule morfologicamente omogenee hanno acquisito il medesimo destino nello sviluppo.

Le linee enhancer trap sono particolarmente importanti nello studio di organi complessi che consistono di una grossa varietà di cellule simili tra loro.

Enhancer trap in *Arabidopsis*

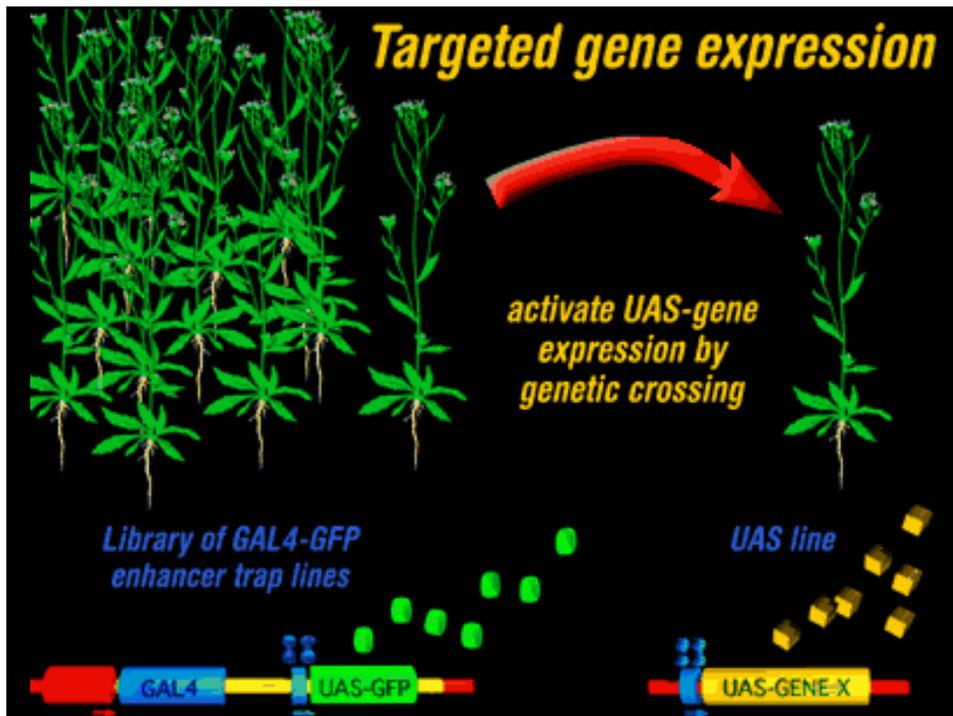
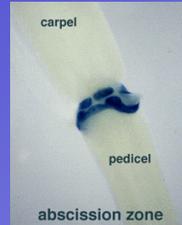
La tecnica dell'enhancer trap permette inoltre di identificare nuovi geni basandosi sul loro pattern di espressione.

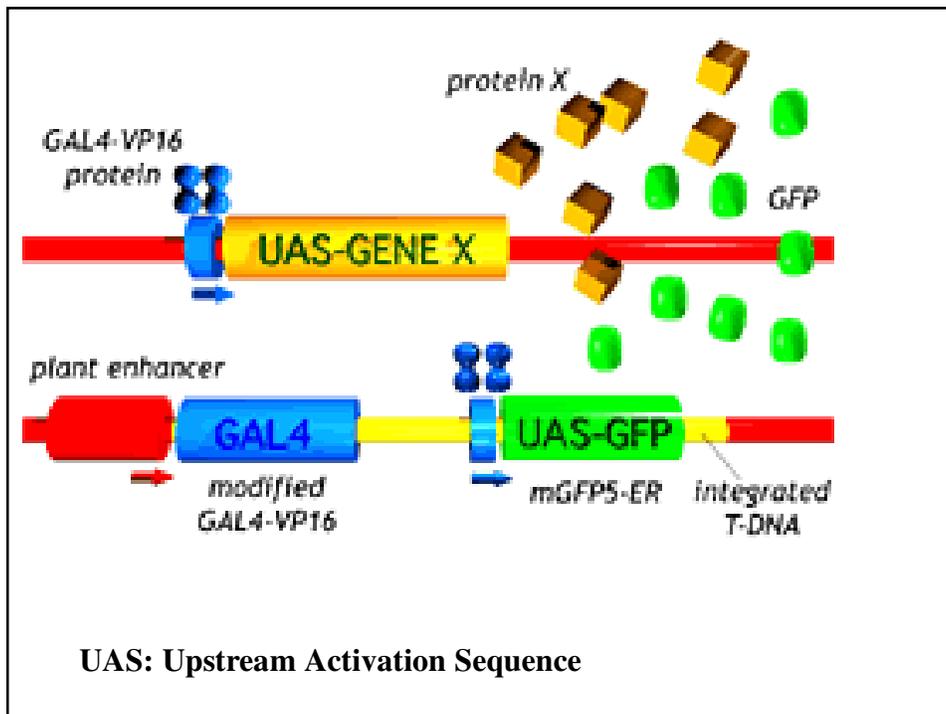
L'analisi di linee enhancer trap di *Arabidopsis* si basa sulla selezione di linee che mostrano uno specifico pattern d'espressione e non su fenotipi mutati.

Un vantaggio di questa tecnica rispetto all'analisi di mutanti consiste nel fatto che anche se l'inserzione del T-DNA (enhancer trap) avviene in un gene essenziale la pianta sarà in quasi tutti i casi vitale essendoci nella generazione T₁ una condizione di emizigosi.

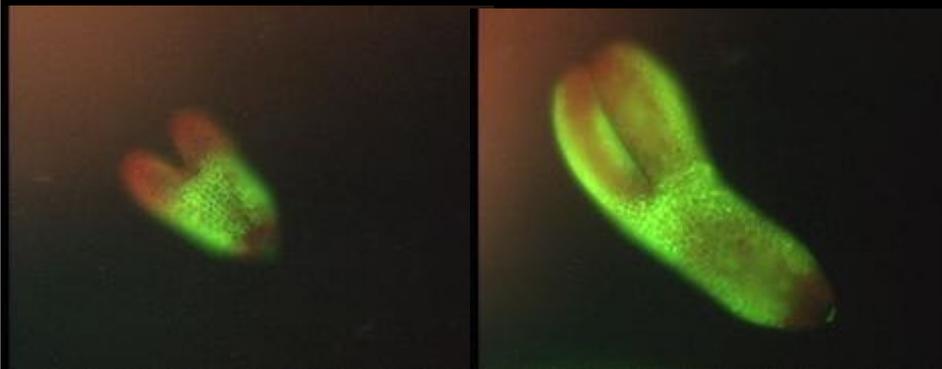
La possibilità di disporre di linee di *Arabidopsis* enhancer trap permette anche di ottenere, mediante incroci, piante in cui si può far esprimere un determinato gene in un limitato numero di cellule o tessuto.

Enhancer trap (GUS) in *Arabidopsis*

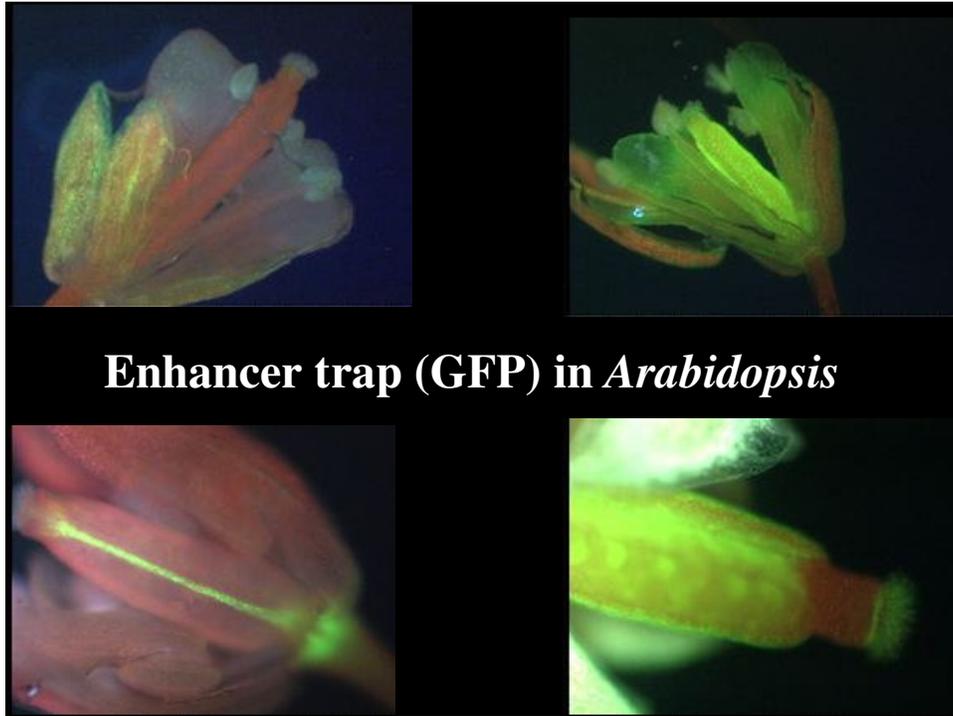




Enhancer trap (GFP) in *Arabidopsis*

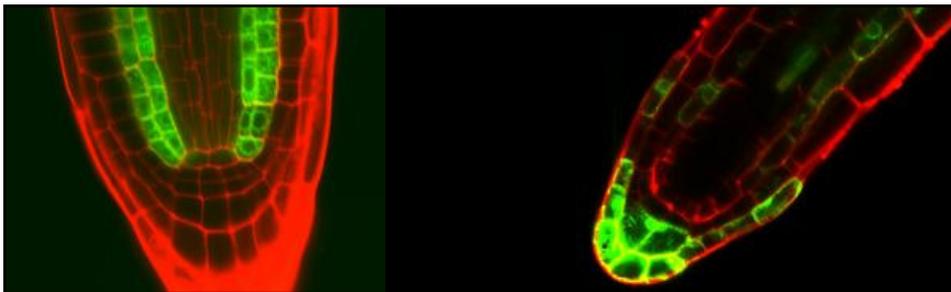
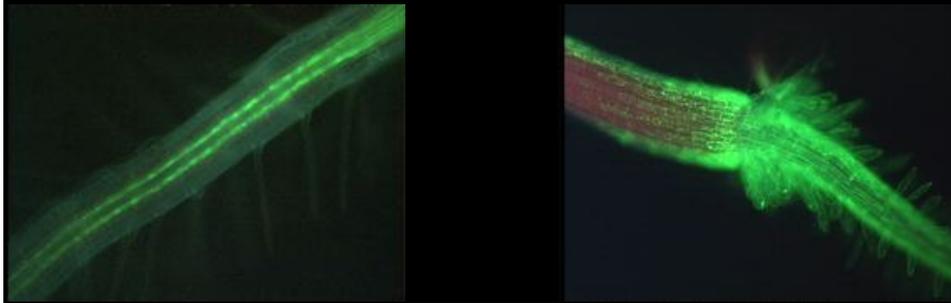


Embrioni transgenici di *Arabidopsis*

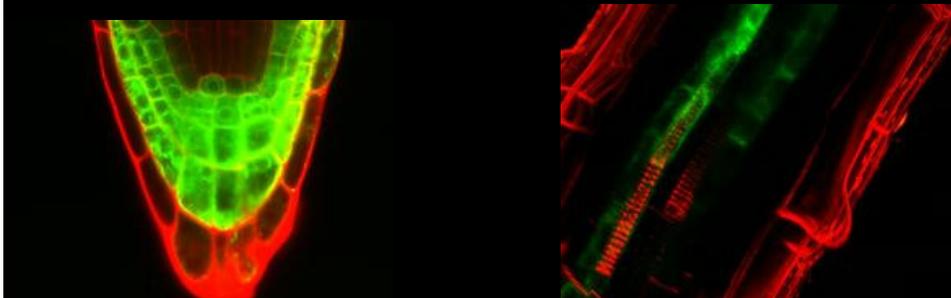




Fotografie di radici di linee di *Arabidopsis*
al microscopio a fluorescenza



Immagini prese al microscopio confocale di apici radicali di differenti
linee di *Arabidopsis*

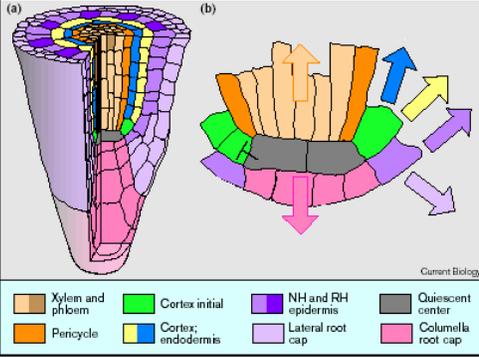


***Arabidopsis* è anche molto
utilizzata per capire il pattern
di sviluppo dei vari organi, in
particolare della radice**

L'impiego di linee enhancer trap ha permesso la
“ricostruzione” tridimensionale della radice (Haseloff lab)

Arabidopsis provides an ideal model system for studying genetic and cellular interactions during development. The organism is highly amenable to conventional and molecular genetic approaches, its architecture and development are well characterised, and the sequence of the entire genome is accessible. In addition, the root meristem provides an ideal test-bed. It possesses indeterminate growth, and has a simple and transparent architecture. In order to dissect local cell-cell interactions it is crucial that we can clearly visualise individual cells inside living meristems and have the means to manipulate them. Over the last few years, an exciting new set of microscopic and genetic tools have been developed for directly manipulating gene function and cellular development in live plants (Haseloff website).

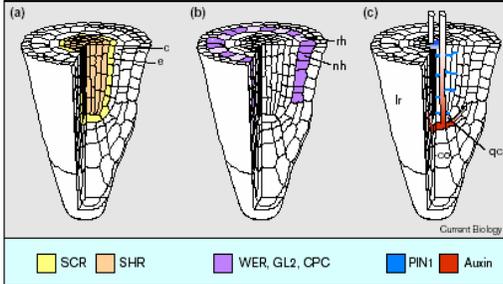
L'organizzazione della radice di *Arabidopsis* è molto semplice e permette di studiare il pattern di formazione



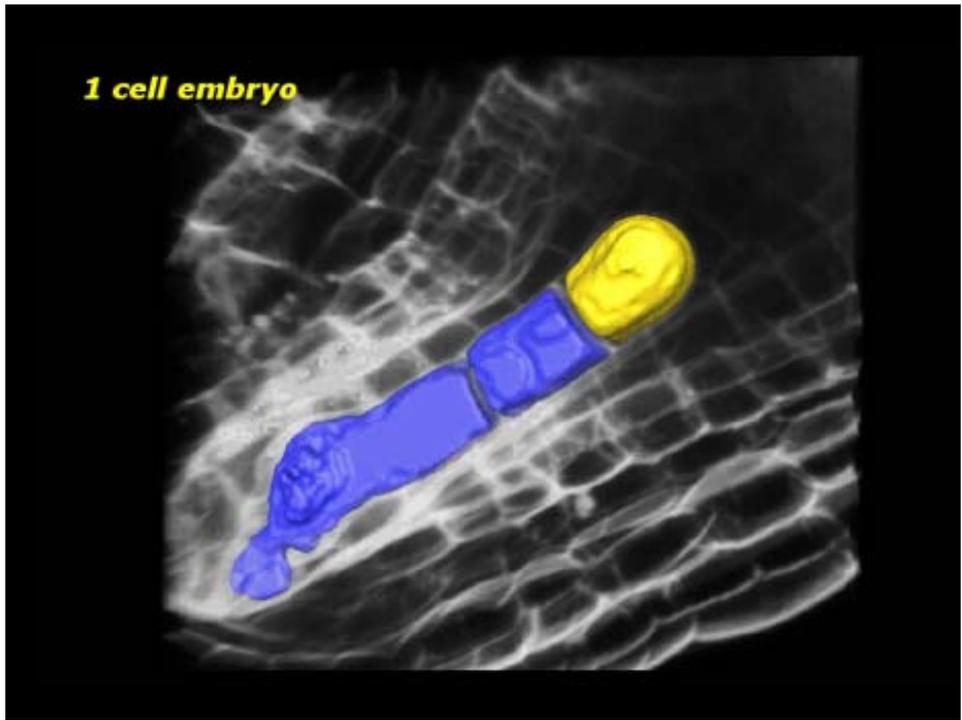
Cell fate in the *Arabidopsis* root meristem. (a) Cell types. (b) Stem cells (initials) and their direction of cell division.

Xylem and phloem	Cortex initial	NH and RH epidermis	Quiescent center
Pericycle	Cortex; endodermis	Lateral root cap	Columella root cap

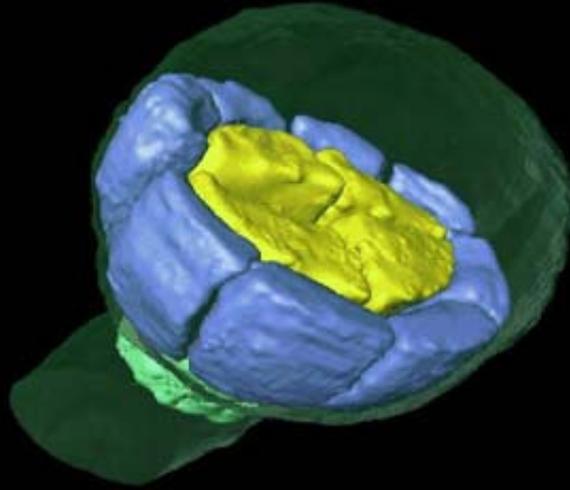
Il trasporto polare dell'auxina è fondamentale nel processo di formazione della radice.



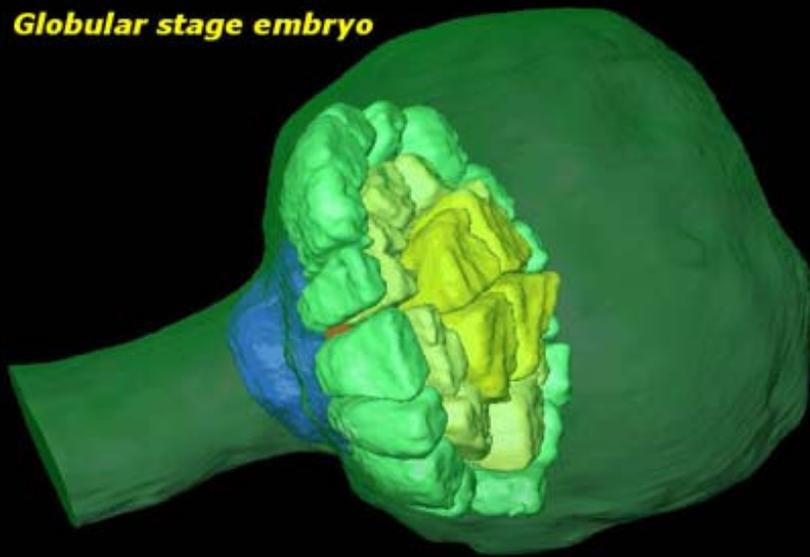
(a) SCR SHR (b) WER, GL2, CPC (c) PIN1 Auxin

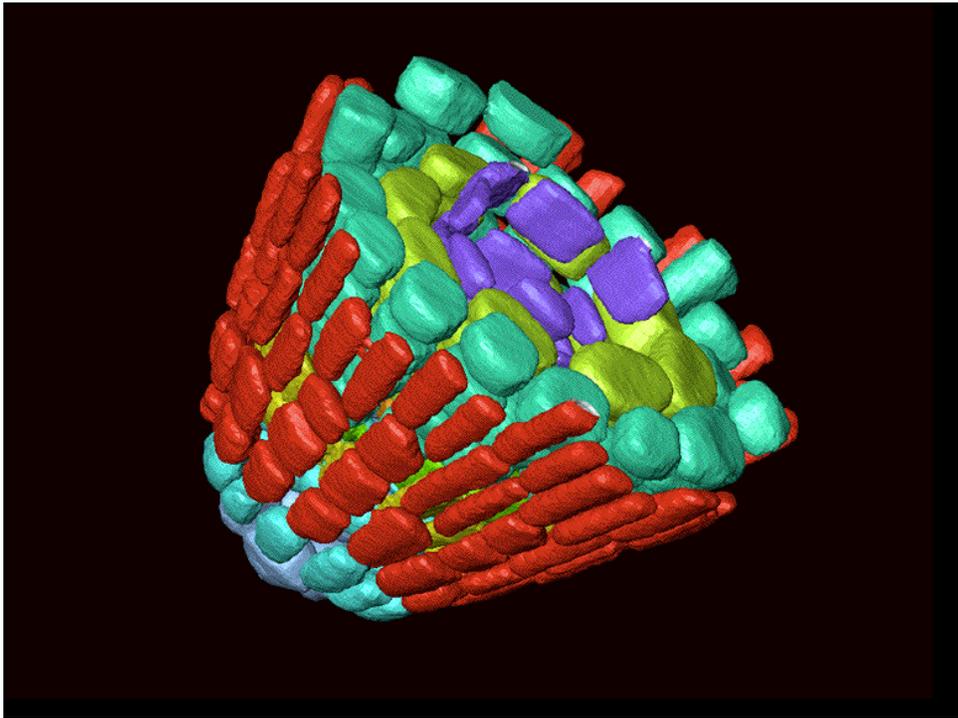
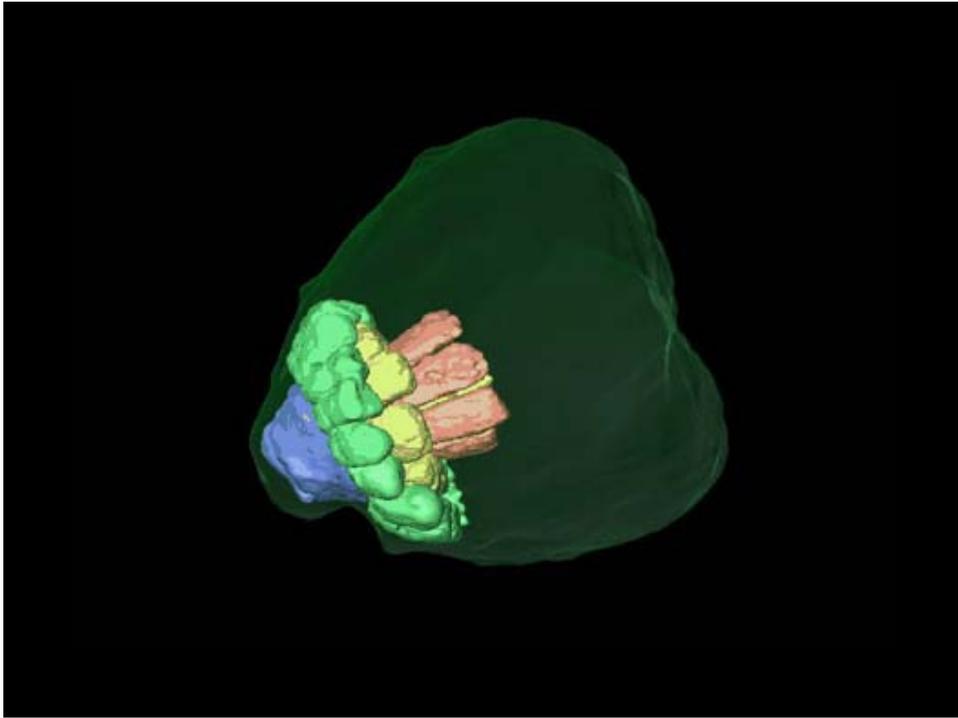


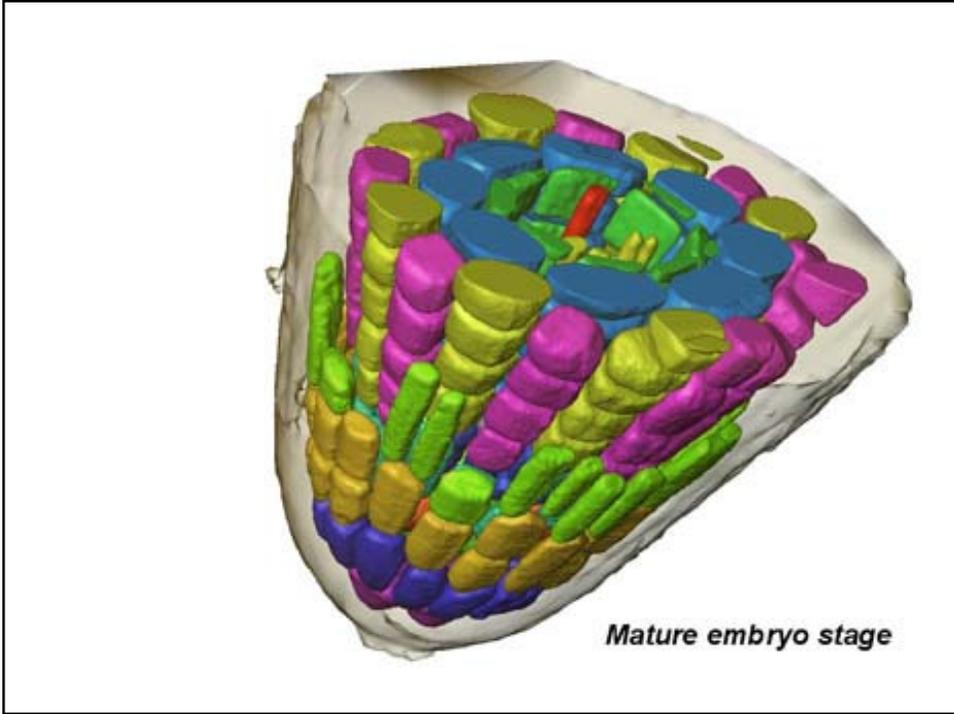
Protoderm stage embryo



Globular stage embryo







FILMATO

Difetti di *Arabidopsis*

Le dimensioni ridotte della pianta spesso rendono difficile l'isolamento di DNA, RNA e proteine

Non è ancora stata messa a punto una tecnica di ricombinazione omologa del DNA

Mancanza di organi specializzati

Mancanza di interazioni con micorizze o batteri azotofissatori (caratteristica presente nel 95% delle specie vegetali)

Difficoltà di ottenere linee embriogeniche

WEBSITES

<http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/> Linee GAL4-GFP e ricostruzione 3D

<http://www.its.caltech.edu/~plantlab/html/index.html> Geni Omeotici

<http://www-biology.ucsd.edu/others/yanofsky/home.htm> Geni Omeotici

<http://weeds.mgh.harvard.edu/atlinks.html> Arabinet

<http://www.pe.ipw.agrl.ethz.ch/pages/roots/arabidopsis.htm> Sistema modello

<http://www.arabidopsis.org>

ARTICOLI E CAPITOLI

Arabidopsis thaliana: A model plant for genome analysis. SCIENCE VOL 282 23
October 1998 Pag.662-682

The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana* NATURE VOL 3
February 2002 Pag. 124-136

Biologia dello sviluppo. Pag.200-219 e Pag. 48-51 L. Wolpert Zanichelli
Root development. CURRENT BIOLOGY VOL 10 No22 1 November 2000 Pag.
813-815